

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP98/05348

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

10 June 1999 (10.06.99)

International application No.:

PCT/JP98/05348

Applicant's or agent's file reference:

CGS 98-04 PCT

International filing date:

27 November 1998 (27.11.98)

Priority date:

27 November 1997 (27.11.97)

Applicant:

KATO, Yukio et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 November 1998 (27.11.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N 33/53 // A61K 38/16, 45/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/28458</p> <p>(43) 国際公開日 1999年6月10日(10.06.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05348</p> <p>(22) 国際出願日 1998年11月27日(27.11.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/342060 1997年11月27日(27.11.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤幸夫(KATO, Yukio)[JP/JP] 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稲田三丁目6-9-501 Hiroshima, (JP)</p> <p>河本 健(KAWAMOTO, Takeshi)[JP/JP] 〒754-1200 山口県吉敷郡阿知須町2580番地17 Yamaguchi, (JP)</p> <p>小谷野康彦(KOYANO, Yasuhiko)[JP/JP] 〒734-0002 広島県広島市南区西旭町14-24-405 Hiroshima, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENE ORIGINATING IN HUMAN FETAL CHONDROCYTES</p> <p>(54)発明の名称 ヒト胎児軟骨細胞由来遺伝子</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A gene originating in human fetal chondrocytes. The protein encoded by this gene has a characteristic structure and thus serves as a cytoskeleton regulator which binds to proteins on the cell membrane and simultaneously as an epistatic factor regulating the function of Rho. Namely, it has both the ezrin-like domain and the DH and PH domains.</p>		

(57)要約

本発明は、ヒト軟骨細胞由来遺伝子を提供する。すなわち、本発明に係るヒト軟骨細胞由来遺伝子によりコードされるタンパク質は、細胞膜上のタンパク質と結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、Rho の機能を調節する上位因子である特徴的構造を有する。すなわち、エズリン様 ドメインと、DHドメインとPHドメインを共に有するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		

明細書

ヒト胎児軟骨細胞由来遺伝子

5 技術分野

本発明は、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子、該遺伝子がコードするタンパク質、及び、該タンパク質に対する抗体に関するものである。

背景技術

10 従来、ヒトの軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法が確立されていなかったため、分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索や該遺伝子のコードするタンパク質の性質の解析は困難であった。

発明の開示

15 最近本発明者は、ヒトの軟骨細胞を分化状態で単層培養する方法を見いだした (M. Shen, T. Kawamoto, W. Yan, K. Nakamasu, M. Tamagami, Y. Koyano, M. Noshiro, and Y. Kato Biochemical and Biophysical Research Communications 236, 294-298 (1997))。本発明者は、係る培養方法を用いることで、ヒト由来の分化状態にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子の探索が可能であることを見いだ
20 した。

本発明者は、かかる知見に基づき、分化状態にあるヒト由来軟骨細胞と、脱分化した前記軟骨細胞との間で、発現に差異のある遺伝子を探索し、前者細胞に特異的に発現している遺伝子を見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、分化状態にある細胞（種々の動物における細胞、特に軟骨細胞を含み、かつヒト由来の軟骨細胞を含む）に特異的に発現している遺伝子、
25 該遺伝子がコードするタンパク質、さらには、該タンパク質に対する抗体を提供

するものである。さらには、該遺伝子若しくはその断片、又はそれらの相補塩基配列、該タンパク質若しくはその改変体、又はそれらの断片、又は該抗体を用いた、分化軟骨細胞検出キットと分化軟骨細胞検出方法、又は細胞分化誘導調節剤のスクリーニングキットと細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法を提供するものである。

より詳しくは、本発明は、[1] エズリン様ドメイン、Dblドメイン、およびプレックストリンドメインを含む、分化軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質を提供するものである。また、[2] 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質を提供するものである。また、[3] 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、(1) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、(2) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、かつ(3) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列と85%以上の同一性を有し、分化軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質を提供するものである。

さらに、本発明は、[4] 前記[1]～[3]のいずれか1つに記載のタンパク質をコードするDNAを提供するものである。また、[5] 以下の(a)又は(b)に示すDNAからなる遺伝子を提供するものである。すなわち、(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列からなるDNA、(b) 配列表の配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ分化

軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質をコードする DNA。また、[6] 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列の一部若しくは全部の塩基配列、又はそれらの相補塩基配列を有する DNA を提供するものである。

さらに、本発明は、[7] 前記 [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のタンパク質に対する抗体を提供するものである。

さらに、本発明は、[8] 以下の(a)から(c)の少なくとも 1 つを有効成分として含むことを特徴とする、分化軟骨細胞検出キットを提供するものである。すなわち、(a)前記 [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のタンパク質、(b) [4] ~ [6] のいずれか 1 つに記載の DNA、(c) [7] に記載の抗体。さらに、[9] 前記 [8] に記載のキットを用いることを特徴とする分化軟骨細胞検出方法を提供するものである。

さらに、本発明は、[10] 以下の(a)から(c)の少なくとも 1 つを有効成分として含むことを特徴とする、細胞分化誘導調節剤のスクリーニングキットを提供するものである。すなわち、(a)前記 [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のタンパク質、(b)前記 [4] ~ [6] のいずれか 1 つに記載の DNA、(c)前記 [7] に記載の抗体。また、[11] 前記 [10] に記載のキットを用いることを特徴とする細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法を提供するものである。

さらに、[12] 前記 [11] に記載の細胞分化誘導調節剤が抗癌剤である、スクリーニング方法を提供するものである。

本発明に係るタンパク質のアミノ酸配列は、N 末端側から、エズリン(Ezrin)様ドメイン、Dbl ホモロジー (DH) ドメイン、プレックストリンホモロジー(Pleckstrin homology)(PH)ドメインという 3 つのドメインを 1 つの分子内に含んでいるものである。従って、この新規タンパク質は、細胞膜近傍に存在し、細胞形態の維持や運動を司るアクチン系細胞骨格の機能を調節している Rho ファミリーの活性を制御する極めて重要な因子である可能性を有するものである。

また、本発明に係るタンパク質の機能を活性化あるいは抑制することにより、

細胞分化誘導や癌の増殖を調節する薬剤等の開発が可能となる。

また、軟骨の分化や変性のメカニズムを解析する上で不可欠なプローブ等の開発を可能とする。また、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する遺伝子治療の開発を可能とする。

5

図面の簡単な説明

10

図1は、CDEP cDNAの核酸塩基配列、および導かれるアミノ酸配列を示す図である。ここでエズリン様ドメインは白抜き枠で示される。また、Dblホモロジー (DH) ドメインは下線で示される。また、プレックストリンホモロジー (PH) ドメインは2重線で示される。タンパク質コード領域の下流の星印はストップコドンを示す。ポリ (A) 付加シグナルは点線で示されている。ポリ (A) 付加サイトは三角形で示されている。

15

図2Aは、種々のヒト胎児組織における、CDEP mRNAのノーザンブロット分析の結果を示す電気泳動写真である。ここで、Ch-は、Bt2cAMP 無処理繊維芽軟骨細胞、Ch+は、Bt2cAMP 依存性分化軟骨細胞；Br は脳、He は心臓；Li は肝臓；Sp は脾臓；In は腸；Lu は肺、Te は精巣；Pl は胎盤；Mu は筋肉を示す。CDEP mRNAの大きさは kb で表されている。

20

図2Bは、種々の成人組織におけるCDEP mRNAのノーザンブロット分析の結果を示す電気泳動写真である。ここで、Ch-は、Bt2cAMP 無処理繊維芽軟骨細胞、Ch+は、Bt2cAMP 依存性分化軟骨細胞；Br は脳、He は心臓；Li は肝臓；Sp は脾臓；In は腸；Lu は肺、Te は精巣；Pl は胎盤；Mu は筋肉を示す。CDEP mRNAの大きさは kb で表されている。

25

図3は、エズリン様、Dbl ホモロジー (DH) ドメインの配置と、ヒトCDEPのエズリン様ドメイン、エズリンおよびバンド4.1の比較を示す図である。ここでCDEPとの間で保存されている残基は、太字で示される。

図4は、ヒトCDEPのDHドメインと、ヒトDbl、ラットOst、マウスEst2、

およびヒト FGD1 との比較を示す図である。ここで CDEP との間で保存されている残基は、太字で示される。

図 5 は、CDEP と他のタンパク質との関係を示す模式図である。

5 図 6 は、ヒト胎児軟骨細胞において、 Bt_2cAMP に対応して発現する、タイプ I コラーゲン、アグリカン、軟骨マトリックスタンパク質 (CMP)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (上)、DEC1、および CDEP (下) の mRNA の RT-PCR (reverse transcription PCR) 分析の結果を示す電気泳動写真である。ここで cAMP+ は、 Bt_2cAMP 存在を、および cAMP- は、 Bt_2cAMP 不存在を示す。

10 図 7 は、実施例 4 において、R、G1、G2、G3 の各部での CDEP、タイプ X コラーゲン、ALP、およびアグリカンの発現を示す。

図 8 は、軟骨細胞の各分化段階における CDEP の発現と PTH 添加による影響を示す。

図 9 は、CDEP 発現における Bt_2cAMP および PTH の添加の経時変化を示す。

15 図 10 は、CDEP 発現における PTH の添加の経時変化を示す。

図 11A は、CDEP の細胞内における局在を示す免疫蛍光染色の結果 (CNF2(-) 条件) を示す。

図 11B は、CDEP の細胞内における局在を示す免疫蛍光染色の結果 (CNF2(+) 条件) を示す。

20

発明を実施するための最良の形態

(タンパク質、それをコードする DNA)

本発明により提供されるタンパク質は、配列表の配列番号 1 において示される本発明により見出された DNA から導かれるものであり、その好ましい例として
25 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有する。これは、後記実施例に示すように、分化状態のヒト由来軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を探索した結果、

初めて得られたものである。この導かれたアミノ酸配列を有するタンパク質を本明細書においては、CDEPとも呼ぶ。また、以下説明するように前記タンパク質と異なるアミノ酸を有するものではあるが、実質的に同じ機能を有するタンパク質をもCDEPと総称することとする。

5 前記タンパク質CDEPをコードする遺伝子（以下、CDEP cDNAとも呼ぶ）として得られた全ヌクレオチド配列は配列表の配列番号1に記載されている。また、得られたヌクレオチド配列から演繹されるアミノ酸との対応については、配列表の配列番号1及び図1（アミノ酸は3文字表記で示す）において示されている。

10 CDEP cDNAは、ヌクレオチド残基49番目に存在する最初のATGコドンから開始する3135bpのオープンリーディングフレームを含むものである。また、5'領域（ヌクレオチド残基34番目）の上流にフレーム内ストップコドンがあることから、最初のATGが開始コドンと帰属される。従って、CDEPは1045アミノ酸残基からなり、計算される分子量は118.6kDaと推定されるものである。

15 上記塩基配列から導かれるCDEPのアミノ酸配列は配列表の配列番号2および図1に記載されている。この得られたアミノ酸配列から、CDEPのアミノ酸配列は、分泌のためのシグナルペプチドと、膜通過性または膜結合性ドメインの疎水性領域を欠いていることがわかる。

20 また、少なくとも3つのポリアデニル化シグナルとポリアデニル化サイトがあることがわかる。ポリAトラクトを除く、3287bp、3306bp、または3442bpの全長は、以下説明するノーザンブロット分析により決定されたmRNAのサイズ（3.5kb、図2（a）で矢印3.5kbと記載）に合致するものである。

25 また、前記アミノ酸配列について、タンパク質データベースによるホモロジー検索の結果、前記CDEPタンパク質は、エズリン様（Ezrin-like）ドメイン

と、DHドメインと、およびPHドメインとの3つの機能的ドメインがともに含まれていることがわかる(図1、3、4)。エズリン様ドメインと、DHドメインと、PHドメインとを共に有するタンパク質は従来知られていない。

ここで、CDEPが有するエズリン様ドメインとは、従来知られているエズリン、ラディキシン、モエシンおよびバンド4.1を含むバンド4.1スーパーファミリーにおいて保存されているものを意味する。図3には、それらとの相同性について示したが、CDEPのエズリン様ドメインは、エズリンとは27.5%の相同性を、またバンド4.1とは43.7%の相同性を有する。

また、エズリン等のタンパク質は、細胞骨格と細胞膜間のリンカータンパク質としての役割があると考えられている。また、最近報告されている、N末端領域にエズリン様ドメインを含むいくつかのタンパク質の中で、マーリンは、神経繊維腫タイプ2の原因となる腫瘍抑制分子であり、PTPMEG1とPTPH1は、細胞質タンパク質チロシンリン酸化酵素(PTP、protein tyrosine phosphatase)ファミリーのメンバーであることが知られている。これらのタンパク質は細胞膜と細胞骨格間の境界での細胞外から細胞内へのシグナル伝達に参与していることが知られている。さらに、注目すべきことは、エズリン、ラディキシンおよびモエシン(これらをERMタンパク質という)は、ヒアルロン酸レセプターであるCD44の細胞質ドメインにそれらのN末端領域を通じて結合することである。また、CD44へのERMタンパク質の結合は、GTP γ Sにより強化され、Rhoの特異的インヒビターであるC3トキシンで著しく抑制されることである。このように、GTP-Rhoは、CD44/ERMタンパク質複合体の形成に必要とされるものである。

本発明にかかるCDEPタンパク質はさらに、DHドメインおよびPHドメインをも有するものである。オンコジーン生成物であるDbl、Ost、Ect2、Lbc、および faciogenital dysplasia 原因遺伝子であるFGD1を含むRhoGEFファミリーも、DHドメインを含み、そのC末端では直接PHドメイ

ン (DH-PH配列) に結合していることが知られている。CDEPとの間のDHドメインの相同性は、Dblとは22.9%、Ostとは22.9%、Ect2と22.3%、およびFGD1とは25.6%である (図4)。

ここで、RhoGEFは、特にGDP-Rho (不活性型) をGTP-Rho (活性型) へと変化させ、一方RasGEFsはGDP-RasをGTP-Rasへ変化させることが知られている。RhoおよびRasは低分子量GTP結合タンパク質スーパーファミリーに属し、細胞内シグナル伝達に与ることが知られている。またスーパーファミリーは5つのサブファミリー、即ち、Ras、Rho、Rab、Arf、およびその他に分けられる。このRhoサブファミリー (Rho、RacおよびCdc42) は、細胞の形態、移動、凝集、接着を、アクチンフィラメントの収縮により制御するものであることが知られている。Rhoカスケードの上流には、GEFsおよびGTPase活性タンパク質 (GAPs) のようなRhoのいくつかの制御因子 (regulator) が存在することも知られている。

また、DH-PHドメインは、RhoGEF活性に必要であり、一方Cdc-25ドメインは、RasGEF活性に必要であること、Ras-GRFおよびSosのようなRasGEFファミリーメンバーのいくつかは、RasGEF活性を有するが、たとえそれらがCdc-25ドメインに加えてDH-PHドメインを有していてもRhoGEF活性はないことが知られている。

以上説明したように、本発明に係るCDEPの特徴として、上で示したように、Cdc-25ドメインを欠き、DH-PHドメインを含むことから、CDEPは、RasGEPファミリーではなく、RhoGEFファミリーのメンバーの1つである。

エズリン様ドメインを有するERMタンパク質は、CD44/ERM/アクチン複合体の形成を通じて細胞の形態変化を導くシグナル伝達に与ることが知られているが、この複合体の形成には、RhoのRhoGEFによる活性を必要

とする。本発明において得られたCDEPは、一分子内で、エズリン様ドメインと、RhoGEF様ドメインを共に含むという極めてユニークなタンパク質であることがわかる(図5)。これは、CD44経路および/または他のレセプターを介する経路においてシグナル伝達を変更する可能性を示唆している。さらには、RhoGEFファミリーの多くのメンバーが、N末端領域の欠如によって、がん遺伝子となっていることから、CDEPが、軟骨細胞を含むあるタイプの細胞の接着、拡散、移動、増殖、および分化を制御するに重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

従って、本発明に係るCDEPタンパク質は、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質だけでなく、配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成るもので、分子内にエズリン様ドメイン、及びDH、PHドメインを共に有する新規なアミノ酸配列を有するものも含む。

特に、配列番号2におけるアミノ酸番号で1～373のアミノ酸配列(エズリン様ドメインという)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有し、さらに配列番号2におけるアミノ酸番号で544～737のアミノ酸配列(DHドメインという)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有し、かつ、配列番号2におけるアミノ酸番号で764～854のアミノ酸配列(PHドメインという)が、該配列番号2のアミノ酸配列と70%以上(好ましくは85%以上)の相同性を有するものを含む。

係るアミノ酸配列を有するタンパク質は、CDEPの特徴である、エズリン様、DH、PHドメインと実質的に同じドメインを有し、従って、CDEPと実質的に同様の生化学的機能を有するものと推定される。

さらに、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するCDEPと異なるアミノ酸を有し、かつ実質的に同じ機能を有するCDEPタンパク質は、配列

表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の特定のアミノ酸残基を置換、欠失又は挿入する方法で得ることが可能である。かかる方法は特に制限されず、通常公知の方法が好ましく使用できる。例えば、部位特異的突然変異などの公知の方法によって塩基配列にヌクレオチドの置換、欠失、挿入などの変異を導入することによって生じさせることができ、当業者は容易に選択することができる。すなわち、特定のタンパク質と同等の機能を有する誘導体は、当技術分野において周知の化学的ペプチド合成、または通常の遺伝子工学的手法、たとえばサムブルック (Sambrook) ら (分子クローニング (Molecular Cloning), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第 2 版、1989) により開示されているような DNA 配列に基づいた組換え DNA 技術のいずれの方法でも作成することが可能である。具体的には、たとえば H. ニューラス (Neurath) R. L. ヒル (Hill) により「蛋白質 (The Proteins)」 (Academic Press, New York, 1979, 特に 14 頁の図 6 参照) に述べられている方法が使用可能である。最も通常起こる置換は : Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly およびこれらの逆である。

従って、前記 C D E P タンパク質をコードする DNA も、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものだけでなく、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成るもので、かつ分子内にエズリン様ドメイン、及び D H、P H ドメインを共に有する新規なアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA も含む。

特に、配列番号 2 におけるアミノ酸番号で 1 ~ 3 7 3 のアミノ酸配列 (エズリン様ドメイン) が、該配列番号 2 のアミノ酸配列と 85% 以上の相同性を有し、さらに配列番号 2 におけるアミノ酸番号で 5 4 4 ~ 7 3 7 のアミノ酸配列 (D H ドメイン) が、該配列番号 2 のアミノ酸配列と 85% 以上の相同性を有し、かつ、

配列番号 2 におけるアミノ酸番号で 7 6 4 ~ 8 5 4 のアミノ酸配列 (PHドメイン) が、該配列番号 2 のアミノ酸配列と 85% 以上の相同性を有するタンパク質をコードする DNA を含む。

5 なお、ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNA が 2 本鎖である場合には、相補 2 本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有するものを含む。本発明 DNA は、さらに、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号 4 9 ~ 3 1 8 3 の塩基配列若しくはその相補塩基配列からなる DNA を含むものである。

10 さらに本発明は、前記 C D E P タンパク質をコードする DNA 配列、およびそれらの相補鎖、またはこれらの配列を含む DNA 配列、該配列またはそれらから誘導される断片と標準的条件下でハイブリダイズする DNA 配列、および遺伝子コードの縮退という理由により上記 DNA 配列と標準的条件下でハイブリダイズはしないが全く同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA 配列も含む。

15 ここで、ハイブリダイゼーションの「標準的条件」とは、特異的ハイブリダイゼーションシグナルを検出するのに当業者により一般的に使用され、かつ例えばサムブルック (Sambrook) ら (分子クローニング (Molecular Cloning), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第 2 版、1989) により述べられている条件、好ましくは、当業者に公知のサムブルック (Sambrook) らにより述べられたいわゆるストリンジントハイブリダイゼーション-非ストリンジント洗浄条件、より好ま
20 しくはいわゆるストリンジントハイブリダイゼーション-ストリンジント洗浄条件を意味する。本発明において好ましく用いられる前記ストリンジントな条件は、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、より具体的には、
25 相同性が高い核酸同士、例えば完全にマッチしたハイブリッドの T_m から該 T_m より 2 0 °C 低い温度までの範囲の温度、あるいは 8 0 % 以上の相同性を有する DNA 同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない

条件が挙げられる。

さらに当技術分野で周知の方法を使用して、本明細書に開示されている配列表の配列番号 1 の DNA 配列に基づいて設計したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により作成できる DNA 配列を提供することもまた本発明に含まれる。

5 本発明に係る上記 DNA は、本発明により後記実施例に示すように、その塩基配列の一つが決定されたので、この配列に基づいて合成することが可能である。また、この塩基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いた PCR 又はハイブリダイゼーションによって染色体 DNA から得ることもできる。あるいは、軟骨の mRNA を用いて RT-PCR を行うこと、軟骨などの cDNA ライブラリーを、CDEP タンパク質の全部又は一部をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングすることによっても得ることができる。

10 また、上記本発明に係る CDEP タンパク質は、公知の発現ベクターに前記説明した本発明 DNA を挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを導入して形質転換された細胞を得、形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明タンパク質を培養物中に生成蓄積させ、その培養物から該タンパク質を採取することによって製造することができる。

15 細胞及び発現ベクターとしては、外来タンパク質の発現に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例えば、大腸菌等の原核細胞とそれに適した発現ベクター、哺乳類細胞等の真核細胞とそれに適した発現ベクターの組み合わせが挙げられる。培地や培養条件は、用いる細胞に合わせて適宜選択される。

20 本発明タンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。また、本発明タンパク質は全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

25 培養物とは、培地および当該培地中の細胞であり、培養物からの本発明タンパク質の採取は、上記の本発明タンパク質の活性等を指標にして、公知のタンパク

質の精製方法によって行うことができる。

また、必要に応じて、前記塩基配列情報を（使用コドン considering）利用することにより、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列に従って合成されたプローブを用いるコロニーハイブリダイゼーションまたはサザンブロットハイブリダイゼーションにより、または該情報により合成されたプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、異種の生物からも単離可能である。

(抗体)

本発明に係るタンパク質に結合し得る抗体（以下、本発明抗体ともいう）は、本発明タンパク質を抗原として用いて、常法に従って作製することができる。本発明抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。

本発明タンパク質は、そのまま抗原として用いてもよいが、キーホールリンベットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリアタンパク質と結合させて、及び／又は、アジュバントを併用して抗原として用いることが好ましい。

ポリクローナル抗体は、例えばマウス、ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈内注射等により投与することにより免疫し、免疫した動物から血清を採取することによって得ることができる。

モノクローナル抗体は、例えば、以下のようにして得ることができる。マウス、ウサギ、モルモット、ヒツジ等の被免疫動物を、上記抗原を皮下、腹腔内、静脈内注射等により投与して免疫した後に脾臓やリンパ節を摘出し、これから採取した細胞と、好ましくは被免疫動物と同種の動物に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させてハイブリドーマを樹立し、得られたハイブリドーマから上記抗原に対する特異的抗体を継続的に産生する細胞株を、スクリーニングとクローニングを繰り返すことによって選択する。こうして選択された細胞株を好適な培地で培養することによって、培地中にモノクローナル抗体を産生させる。あるいは、マウスの腹腔内等の生体内で培養することにより腹水中等に産生させる。

得られたポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の精製法としては、硫酸アンモニウムによる塩析、D E A Eセルロースカラム等を用いるイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラム等を用いるアフィニティクロマトグラフィー、免疫吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。なお、本発明抗体は、
5 例えば、本発明タンパク質及び標識抗体を用いる免疫測定法等により検出することができる。

本発明抗体は、抗原結合部位 (F a b) が保存されている限り、フラグメント化されたものでもよい。フラグメント化された本抗体として具体的には、例えば抗原結合部位を分解しないパパイン等のプロテアーゼで本抗体を分解して得られる F a b を含むフラグメントが挙げられる。
10

本発明抗体は、標識物質と結合させることによって標識化されていてもよい。標識物質としては、タンパク質の標識に通常使用可能なものであれば、特に限定されず、酵素、アイソトープ、蛍光物質等が挙げられる。

本発明に係る、本発明に係るタンパク質を用いる細胞分化誘導調節剤のスクリーニング法としては、具体的には、例えばテトラカルチノーマなどの分化能のある細胞に添加することにより実際の変化、例えば分化したかどうかを形態及び／又はマーカー遺伝子の発現を調べることにより可能である。若しくは、化学合成した種々の薬剤を細胞に添加して、C D E P の発現量を変化させ得るものを検索することにより可能である。
15

(分化軟骨細胞検出用キット、分化軟骨細胞検出方法) 20

本発明にかかる分化軟骨細胞検出方法は、前記説明した本発明にかかる分化軟骨細胞に特異的に発現している遺伝子等を利用するものである。

具体的には、(a)従来公知の方法において、本発明にかかる C D E P タンパク質を用いることで、分化軟骨細胞を特異的に検出可能とする。また、(b) 従来
25 公知の方法において、本発明にかかる D N A 又はその誘導体等を用いることで、分化軟骨細胞を特異的に検出可能とする。さらには、(c) 従来公知の方法にお

いて、本発明にかかる抗体を用いることで、分化軟骨細胞を特異的に検出可能とする。または、これらを組み合わせることの可能である。

(細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法、細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法キット)

5 本発明にかかる細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法は、前記説明した本発明にかかる分化軟骨細胞に特異的に発現している遺伝子等を利用するものである。

 具体的には、(a) 従来公知の方法において、本発明にかかるCDEPタンパク質を用いることで、細胞分化誘導調節剤のスクリーニングを可能とする。また、
10 (b) 従来公知の方法において、本発明にかかるDNAを用いることで、細胞分化誘導調節剤のスクリーニングを可能とする。さらには、(c) 従来公知の方法において、本発明にかかるCDEPタンパク質を用いることで、細胞分化誘導調節剤のスクリーニングを可能とする。または、これらを組み合わせることの可能である。

15 より具体的には、細胞分化誘導調節剤として抗癌剤をスクリーニングする方法としては具体的には例えば、N末端側が欠損した前記CDEP cDNAを導入することにより癌化させた細胞に、化学合成した様々な薬剤を添加して、細胞を正常に復帰させる薬剤を検索することにより可能である。

 さらに、本発明は、前記スクリーニング方法により得られうる細胞分化誘導調節剤を含むものである。

20 (CDEPの生物学的機能)

 本発明により得られたCDEPの生物学的機能についてまとめると、CDEPはEzrin様ドメインと、DH、PHドメインを1分子中に有することから、先ずEzrin様ドメインでRhoGDIをRhoから解離し、つづいてDH、PHドメインによるGDP
25 -GTP交換反応を1分子によって行い、Rhoの活性を調節することで細胞形態を制御していると考えられる。従って、CDEPはRho GEFの中でもRhoの活性化に極

めて有利な因子であると考えられる。

実施例

以下、実施例により本発明を説明する。

- 5 以下説明す実施例において使用しP C R用プライマーは通常の自動合成方法を用いて合成した。

タイプ II コラーゲン用 : CATACCGGTAAGTGGGGCAAGACTG、TGCCCAGTTCAGGTCTCTTA

アグレカン用 : TGCTACTTCATCGACCCCAT、AAAGACCTCACCTCCATCT

CMP 用 : GTCGATTACGTGGAGAGCTA、ATGAACCTCTTCACCAGCTC

- 10 G A P D H 用 : GTCAAGGCTGAGAACGGGAA、TCCACCACCCTGTTGCTGTA

D E C 1 用 : ATCAGACCCAGCTCCCAAAG、CACAGACCCAGCTCCCAAAC

C D E P 用 : CCTTCAGGAAACTCGTGTC、TTGGAGTTGTGTGTGGTCAG

C D E P c D N A フラグメント用 : GCCAAAATAGTCACCTTCCACGAGG、

CCTTCAGGAAACTCGTGTC、AAACGRAAGAAYGTRTGRTGYTCWACACA、

- 15 TTCCAGCTCCTAGAGATTGC、TCGTCTTCGCTCTCCTCAAT、CGGGTAACAAGCAGGCGGACGGA

(実施例 1)

- 20 分化状態における軟骨細胞の培養は、Biochemical and Biophysical Research Communications 236, 294-298 (1997) M.Shen, T.Kawamoto, W.Yan, K.Nakamasu, M.Tamagami, Y.Koyano, M.Noshiro, and Y.Kato に記載の方法に準じ、以下のように実施した。

- 25 およそ妊娠 25 週で自然流産したヒト胎児 (Norman Bethune University of Medical Sciences から入手) の膝関節の大腿骨側の骨端軟骨を採取した。この軟骨から、細切した軟骨を 3 mg/ml のコラゲナーゼ (タイプ IA、Sigma) を含む α 改変イーグル培地 (α -MEM) 中で 3 時間インキュベートすること以外は Simomura et al. (1975) Calcif. Tissue Res. 19, 179-187 に記載の

方法と同じ方法によって軟骨細胞を単離した。得られた細胞を 1×10^5 個/ディッシュの密度でI型コラーゲン被覆ディッシュにまき、10% 牛胎仔血清、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸、32単位/ ml のペニシリン及び $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを含む α -MEM (10 ml/ディッシュ) 中で培養した。サブコンフルエント(subconfluent)になったところでジブチリルcAMP (dbcAMP) (1 mM) を培養培地に添加した。dbcAMPの存在下及び非存在下のいずれかで2週間以上培養した後、細胞の形態学的観察を行うとともに、細胞を集め、エタノールで固定した後トルイジンブルーで染色した。

dbcAMPの存在下で培養した軟骨細胞は球形を呈して、細胞外基質に富んでいたのに対し、非存在下で培養した軟骨細胞は、紡錘形の線維芽細胞様であり細胞外基質に乏しかった。

また、硫酸化プロテオグリカンを選択的に染色するトルイジンブルーによる染色では、dbcAMP存在下で培養した軟骨細胞は、良好に染色されたが、非存在下で培養した軟骨細胞は、ほとんど染色されなかった。

また、分子マーカーとして、II型コラーゲン、アグリカン並びにCMPのmRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。分子マーカーの発現をdbcAMP存在下と非存在下で比較した結果、dbcAMP存在下では分化状態が維持されていることが示唆された(図6)。

従って、dbcAMP存在下で培養した軟骨細胞は、軟骨としての分化状態を維持している、すなわち分化表現型が維持されていると認められた。

dbcAMPの上記効果の用量依存性を調べたところ、該効果は用量依存的に増大し、0.3~0.5 mMで最大になった。

なお、dbcAMPに代えて、ウサギ及びニワトリの軟骨細胞の分化表現型の発現を安定させたり刺激したりすると報告されているbFGF ($0.4 \text{ ng}/\text{ml}$) 及びTGF- β ($3 \text{ ng}/\text{ml}$) を用いて上記と同様に軟骨細胞を培養したが、これらによってはヒト由来の軟骨細胞の分化表現型の発現が維持されなかつ

た。

(実施例2) 分化状態の軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子

実施例1に記載されたようにd b c AMPの存在下及び非存在下に培養された
5 軟骨細胞から、グアニジンチオシアネート／セシウムトリフルオロアセテート法
により全RNAを抽出した。ポリ(A)⁺ RNAをOligotex-dT30 (Roche 社
製)を用いて濃縮した。分化軟骨細胞(+d b c AMP)では発現するが、脱
分化軟骨細胞(-d b c AMP)では発現しないmRNAをコードするクローンを
10 をサブトラクティブハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)法に
より選択した。すなわち、PCRセレクトcDNAサブトラクションキット(Cl
ontech 社製)を用いて、分化軟骨細胞のmRNA由来のcDNAを、脱分化軟
骨細胞のmRNA由来のcDNAの過剰量に対しハイブリダイズさせた。ハイブ
リダイズしない、すなわち分化状態で発現するcDNAをサブプレッションPCR
により増幅した。得られたPCR産物をTテールベクターのpGEM-T (Prom
15 ega 社製)にクローニングし、約120個のクローンの塩基配列決定を行った。
更なる分析のために1個のクローンを選択し、対応するタンパク質産物をCDE
Pと命名した。

CDEPの1.6kbフラグメントをプローブとして用いて、CDEPの mRNA
20 NAの種々のヒト胎児組織における発現をノーザンブロットにより調べた結果を図
2A、2Bに示す。ここで、5.0kbの転写物もまたノーザンブロット分析で
検出されているが、これは、3.5kb mRNAから導かれるPCR産物に加え
て、すなわち多分CDEPプローブとハイブリ可能な5.0kb mRNAから誘
導されたより大きなバンドがRACE-PCRでも見出されたものであると考え
られる。しかし5.0kbの転写物に対応する生成物の塩基配列決定はいまださ
25 れていない。

ノーザンブロット分析による培養軟骨細胞および種々のヒト組織においてのC

DEP mRNAの発現パターンは、図2Aに示すように、サイクリックAMP依存分化軟骨細胞に、2つの主バンド3.5 kbと、5.0 kbが検出されたが、サイクリックAMPなしの繊維芽細胞には検出されなかった。また、胎児組織においては、脳と脾臓が最も高いレベルのCDEP mRNAを示し、心臓、肝臓、腸が低いか中間的なレベルのcDEP mRNAであった(図2A)。さらに、成人組織においては、腎臓、精巣、肺で中程度、心臓、肝臓、小腸ではかなり低い程度の発現量であった(図2B)。

なお、ノザンブロットは以下のようにして行った。全RNA (10 μ g) をホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、ハイボンド-Nメンブラン (Amersham 社製) に転写した。

Bt2cAMP 存在、非存在下で培養されたヒト胎児軟骨細胞、種々のヒト胎児組織(図2A)、および成人組織(図2B)をホルムアルデヒド含有1%アガロースゲルで電気泳動した後ナイロンメンブランに移した。メンブランはCDEPプローブ(CDEP)、又はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプローブ(GAPDH)とハイブリダイズさせた。組織分布を調べるため、種々のヒト胎児組織の全RNAがNorman Bethune University of Medical SciencesのLi Yu博士より提供された。CDEPの1.6 kbフラグメントを [32 P] dCTPで標識し、ハイブリダイゼーションプローブとして用いた。メンブランを65°Cで30分間、0.5% SDSを含む0.2 \times SSCにより洗浄した。洗浄したメンブランにより、-70°Cで増感膜を用いてバイオマックスX線フィルムを感光させた。

CDEPのcDNAの全長の塩基配列決定は以下のように行った。CDEP全長cDNAを、マラソン(Marathon)cDNA増幅キット(Clontech 社製)を用いるラビッドアンプリフィケーションcDNAエンド(RACE, rapid amplification cDNA ends)法により単離した。すなわち、二本鎖cDNAをマラソンcDNAアダプターに連結し、サブプレッションPCRに付した。反応は、アダ

ブタープライマーと、CDEPの塩基配列に基づいてCDEP用に設計した遺伝子特異的プライマーとを用いて行った。増幅したcDNA試料を4%ポリアクリルアミドゲルで分離し、主要バンドのDNAをゲルから抽出し、pGEM-Tにサブクローニングした。サブクローニングされたプラスミドの二本鎖DNA及び一連の合成オリゴヌクレオチドを配列決定テンプレート及び特異的プライマーとしてそれぞれ用いた。DNA配列決定は、シークエナーゼ7-デアザ-dGTP DNAシーケンシングキット (Amersham 社製) 又はABIプリズム310オートシーケンサー (Perkin Elmer) を用いて、サンガー法によって行った。

このようにして決定されたCDEP cDNAの塩基配列とそれから推測されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。また、このアミノ酸配列のみを配列番号2に示す。CDEP cDNAは、3135bpのオープンリーディングフレームを有している。ポリA領域を除いた3287bp、3306bp、または3442bpの長さは、上記ノザンプロット分析で得られたmRNAのサイズ(3.5kb)によく一致する。5'領域(ヌクレオチド34)にインフレームとなるストップコドンがあるので、最初のATGが開始コドンと認められる。

(実施例3) ウサギ肋軟骨成長板スライスにおけるCDEP mRNAの発現

4週齢雄性日本白色家兎の肋軟骨成長板スライス(骨側から近い部分を3つに分けてそれぞれG3、G2、G1とした)および静止軟骨層(Rとした)の各層からそれぞれtotalRNAを抽出し、CDEP mRNAの発現レベルをRT-PCR法を用いて検討した。また、軟骨細胞の分化マーカーであるタイプXコラーゲン、アルカリフォスファターゼ、プロテオグリカンアグリカンの各層における発現レベルをRT-PCR法を用いて確認した。

ここで、totalRNAの抽出は、軟骨組織からグアニジン-塩化セシウム超遠心法により行った。また、RT-PCR法は、SUPERScript Preamplification System (GIBCO BRL 社製)を用い、DNA増幅には、DNAサーマルサイクラー(Perkin-Elmer C

etus 社製)を用いた。

また、軟骨組織から抽出した totalRNA 0.5 μ g から逆転写反応を行い、CDEP の塩基配列に基づいて設計した上流特異プライマー(5'-TCACTTCGTGGTTTCAGAGC-3') および下流特異プライマー(TCGTCTTCGCTCTCCTCAAT-3')を用いて増幅反応を行い、
5 CDEP cDNA 断片を得た。増幅反応条件は、変性反応(95°C、1 分間)、アニーリングおよび伸張反応(65°C、3 分間)に設定し、20 回増幅した。得られた DNA を 1%アガロースゲル上で、100V、15 分間電気泳動した。

PCR サザンプロット法は、以下のように行った。すなわち、電気泳動したゲル中の DNA を 1.5M NaCl を含む 0.5N NaOH 溶液中で変性させた後、6xSSC を用いてナイロンメンブレン Nytran0.45(Schleicher&Schuell 社製)に転写した。このメンブレンを、Oligolabelling Kit(Pharmacia Biochem 社製)により標識した [³²P] 標識 CDEP プローブを含んだハイブリダイゼーション溶液中で、68°C、16 時間のハイブリダイゼーション反応を行った。反応後、メンブレンを洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。放射活性測定には BAS2000 Image analyzer
15 r(Fujix 社製)を使用した。

ウサギ肋軟骨成長板軟骨細胞の培養は以下のように行った。すなわち、4 週齢雄性日本白色家兔の肋軟骨から成長板を分離し、それらを 0.1%EDTA、0.1%トリプシン含有 PBS および、0.05%コラゲナーゼ含有 DMEM にて消化し、軟骨細胞を単離した。6well 組織培養用プレートに、1well あたり 30 万個の細胞を播種し、1
20 0%ウシ胎仔血清を含むアルファ MEM にて培養した。培地交換は、培養 5 日目より 2 日毎に行った。

ウサギ肋軟骨成長板軟骨細胞培養系における CDEP mRNA の発現は、培養 6、10、14、18、22、26 日目に細胞層から totalRNA を抽出し、CDEP mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて検討した。

25 ウサギ肋軟骨成長板軟骨細胞培養系における PTH による CDEP mRNA の誘導は、培養 6、10、14、18、22、26 日目に PTH(1-84)(1×10^{-7} M)を添加し、さらに 24 時

間インキュベートした後に totalRNA を抽出し、各段階における CDEP mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて検討した。

さらに、PTH および cAMP による CDEP mRNA 発現誘導の経時的变化は、培養 12 日目のウサギ肋軟骨成長板軟骨細胞に、PTH(1-84)($1 \times 10^{-7} \text{M}$) および Bt_2cAMP (1mM) を添加し、1、3、6、12、24 時間後に totalRNA を抽出し、CDEP mRNA 発現誘導の経時変化について RT-PCR 法にて検討した。

以上の実験の結果、および以下の（実施例 4）の結果から、(1)in vivo の軟骨組織においては軟骨細胞の最終分化（肥大化、石灰化）マーカーであるタイプ X コラーゲン、ALP の発現の見られる肥大層に CDEP がより多く発現していることが見いだされた（図 7、図 11A、図 11B）。また、(2)in vitro の軟骨細胞培養系では CDEP mRNA は肥大型以降（培養 22 日目以降）により多く発現し、cAMP をセカンドメッセンジャーとする PTH を添加することにより、その発現量はさらに増強されることが見いだされた（図 8）。さらには、(3)CDEP の mRNA のレベルは cAMP および PTH 添加後 0～6 時間での短時間の誘導においては 1 時間というごく早期に一過性に上昇し、その後経時的に上昇することが見いだされた（図 9）。また、PTH 添加後 0～48 時間の処置では 2 相性となっていることが見いだされた（図 10）。

（実施例 4）免疫蛍光染色法による CDEP の細胞内における局在

ヒト肺線維芽細胞株である MRC5 を用いて CDEP の細胞内における局在について検討するために免疫蛍光染色を行った。すなわち、 $1 \times 1 \text{cm}$ のカバーガラスに 3000 個の細胞を播種し、DMEM 中で 24 時間培養した後に、病原性大腸菌由来の細胞壊死因子 CNF2(Cytotoxic necrotizing factor 2) を添加し、添加しないコントロール群とともにさらに 12 時間培養した。PBS で洗浄後、2%パラホルムアルデヒドにて室温で 30 分間固定した後、再度 PBS で洗浄し、0.5%TritonX-100 で 3 分間処置し、さらに PBS で洗浄した。次いで、室温で 5%ヒツジ血清を含む PBS で 1

時間インキュベートし、非特異的結合をブロッキングした。さらに、0.05%Tween
20 含有 PBS(PBST)で洗浄後、PBS で 100 倍希釈した抗 CDEP 抗血清と室温で 2 時
間インキュベートした。次いで、PBST で洗浄後、PBS で 1000 倍希釈した FITC ラ
ベル抗ラビット-ヒツジ IgG(Cappel 社製) と室温で遮光して 30 分間インキュベ
ートし、PBST で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss 社製、LSM410)を用
いて観察した (図 11A,11B)。

その結果、CNF2 無添加では細胞質が全体に染色されたが、CNF2 存在下ではア
クチンの重合が生じ、その際形成された糸状突起や細胞膜のラッフリング部位に
CDEP が局在していることが見いだされた。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明により、分化したヒト由来軟骨細胞に特異的に発
現する遺伝子が提供される。これらは、軟骨の分化や変性のメカニズムを解析す
る上で重要であるばかりでなく、変形性関節症や慢性関節リウマチなどに対する
遺伝子治療の開発にとっても重要である。さらには、本発明に係る CDEP は軟
骨以外の組織においても発現していることから係る軟骨以外の組織においても重
要な作用を示唆するものである。

すなわち、本発明に係る CDEP は、その構造上の特徴から、細胞膜上のタン
パク質と結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、Rho の機能を調節する上
位因子である特徴的構造を有する。アクチン系細胞骨格の制御、すなわち、上
流からのシグナルを受けて Rho を活性化させ、その下流のシグナル伝達を制御す
る場合は、それによって細胞形態の維持、細胞接着、細胞凝集、細胞運動などの
調節していると考えられる。また、細胞骨格の調節因子という側面から考えてみ
ると、細胞増殖因子による刺激や、細胞の形質転換によって起こる細胞骨格の再
構築の際に重要な働きを果たしていることが考えられる。軟骨細胞にとって細胞
形態の変化は、分化と密接な関わりを持っており、分化した軟骨細胞は球形を呈

しているのに対し、脱分化した軟骨細胞は紡錘形を呈していることが知られている。従って、CDEPの機能を亢進あるいは抑制することによって細胞形態を球形に変化させることが可能であれば、軟骨細胞の分化を誘導または維持させることができると考えられる。そのような作用を期待した遺伝子導入などにより、変
5 形性関節症をはじめとする関節疾患において、機能が逸脱（脱分化）した軟骨細胞の分化状態の制御を行うことも可能になると考えられる。

一方、他の Rho GEF ファミリーでは、N 末端側のアミノ酸の欠如を引き起こすような異常により、ガン遺伝子として働くことが知られている。これらは、ガンの浸潤能を高めるとの報告もある。もし、CDEP 遺伝子の一部が欠損するなどの活性型変異により細胞のガン化が起こることが見出されれば、CDEP をター
10 ゲットとして特異的な抑制効果のある新規の治療薬の開発に繋がると考えられる。

また、CDEP のドミナントネガティブな変異体を作成し、その遺伝子をガン細胞に導入してその活性を抑制することによって、ガン治療に結びつけることも考えられる。すなわち、Rho ファミリー全体の機能の制御機構の解明に有用となる
15 可能製がある。

Ezrin は、N 末端で細胞膜上の CD44 などと結合し、C 末端側でアクチンと結合して細胞骨格の調節に関与している。一方、Rho はこの結合を調節していると考えられる。Ezrin-like ドメインを N 末端に、DH, PH ドメインを C 末端に持つ CDEP は、N 末端で細胞膜上のタンパク質と結合し、C 末端側では Rho の活性化を行
20 っていると考えられる。従って、CDEP は細胞膜に結合する細胞骨格の調節因子であると同時に、細胞骨格の状態をフィードバックして Rho へのシグナルを調節している因子であることが考えられる。

請求の範囲

1. エズリン様ドメイン、Db1ドメイン、およびブレックストリンドメインを含む、分化軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質。

5 2. 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

3. 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、

10 (1) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号1～374のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、

(2) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号544～737のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、かつ

15 (3) 配列表の配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列に相当する部分のアミノ酸配列が該配列番号2におけるアミノ酸番号764～854のアミノ酸配列と85%以上の相同性を有し、分化軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質。

4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするDNA。

20 5. 以下の(a)又は(b)に示すDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列からなるDNA

25 (b) 配列表の配列番号1に示す塩基配列における塩基番号49～3183の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ分化軟骨細胞で特異的に発現するタンパク質をコードするDNA。

6. 配列表の配列番号1に示す塩基配列の一部若しくは全部の塩基配

列、又はそれらの相補塩基配列を有する DNA。

7. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対する抗体。

8. 以下の(a)から(c)の少なくとも 1 つを有効成分として含むことを特徴とする、細胞分化誘導調節剤のスクリーニングキット。

5 (a)請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質

(b)請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載の DNA

(c) 請求項 7 に記載の抗体

9. 請求項 8 に記載のキットを用いることを特徴とする、細胞分化誘導調節剤のスクリーニング方法。

10 10. 請求項 9 に記載の細胞分化誘導調節剤が抗癌剤である、スクリーニング方法。

图 1

1/11

図 2A

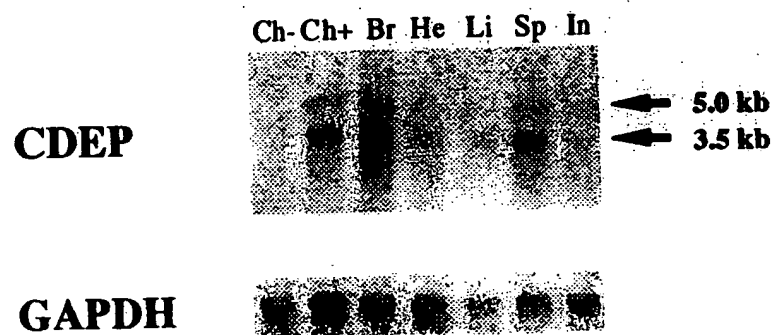
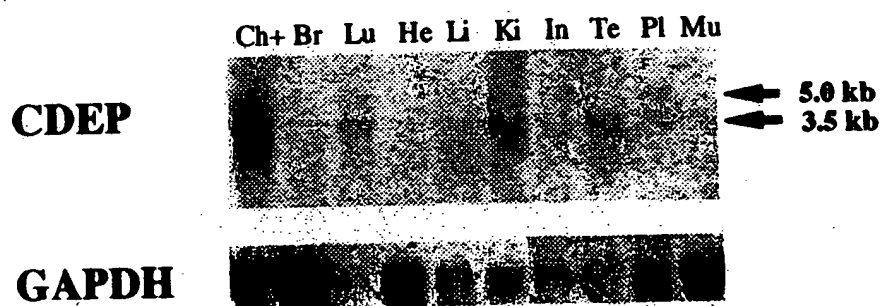


図 2B



3

CDEP	1	MGEIEQRPTPGSRLGAPENSGISTLERGQKPPPTPSGKLVSIKIQMLDDTQEA FEVPQRAP. GKVL
Ezrin	1MPKFINVRTT...MDAELEFA..IQPNTTGKQL
Band 4.1	1MCKVSLDDTVYEC.VVEKHAKGQDL
CDEP	66	LDVAVCNHLNLVEGDYFGLEFPDHHKKITVWLDLLKPIVKQIRRPKHVVVK.FVVKFFPPDHTQLQEE
Ezrin	30	FDQVVKITIGLREVWYFGLHYVDNKGFTWLKDKKVSQAQEVKRNPLQFKFRAKFYPEDVAEELIQ
Band 4.1	27	LKRVCEHLNLLEEDYFGLAIWDNATSKTWLDSAKEIKKQ.VR.GVWNFTFNKVFYPPDPAQLTED
CDEP	131	LTRY.LFALQVKQDLAQGRITCNDTSAALLISHIVQSEIGDFD.EALDREHLAKNKYIPQQ.....
Ezrin	95	DITQKLFLLQVKEGILSDEIYCPPEAVLLGSYAVQAQKFGDYNKEVHKSGYLSERLTFQRVMDQH
Band 4.1	91	ITRYLYC.LQLRQDIVAGRLPCSFATLALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQ.....
CDEP	190DALEDKIVEFHNNHIGQTPAESDFQLEIARLEMYGIRLHPAKDREGTKINLAVANTGILV
Ezrin	161	KLTRDQWEDRIQVWHAHERGMLKDNAMLEYLKAQDLEMYGINYFEIKNKKGTDLWLGVGDALGLNI
Band 4.1	151	...TKELEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENAKKLISMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLV
CDEP	252	FQGFTKINA...FNWAKVRKLSFKRKRFLIKLRPDANSAYQDTLEFLMASRDFCKSFWKICVEHHA
Ezrin	227	YEKDDKLTPKIGFPWSEIRNISFNDRKFVIRPIDKKAPDF...VFYAPRLRINKRILQLCMGNHE
Band 4.1	214	YDKLIRNR...FPWPFLVKISYKRSFFIKIRPGEQEQYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHT
CDEP	315	FFRLFEERP KPKPVLF SRGSSFRFSGRTOQVLDYVKEGGHKKVQ.FERKHSKIHISRS.L
Ezrin	289	LYMRRRKPDITIEVQOMKAQAREKH...QKLERQQLETEKRRRETVEREKEQMMREKEEL
Band 4.1	277	FFRLTS.TDTIPKSKFLALGSKFRYSGRTOAQTRQASALIDRPAPH.FERTASKRAS.RS.L

4

CDEP	544	IAKEVSTERTYKDLVITSWFQSTVSKE...DAMPEAL...KSLIFPNFEPLHKFHTN.FLK.
Db1	499	VLNELIOTERVYVRELYTVLLGYRAEMDNPEMFDLMPPLRNKKDILLFGNMAEIIYEFHNDIFLS.
Ost	446	VMNELLDTERAYVEELLCVLEGAAEMDNPLMAHLISTGLQNKKNILFGNMEEIYHFHNRIFLR.
Ect2	281	VAKELYQTESNVNIIATIIQLFQVPLEEGQGGPILAPEEIKT.IFGSIPDIFDVHMKIKD...
FGD1	376	IANELLOTEKAYVSRHLHLLDQVFCARLLEE..RNRSSFADVVHGIFFSNICSIYCFHQQ.FLLP
CDEP	601	EIEQRLALWEGRSNAQIRDYQRIQDVMLKNIQGMKHLAAHLWKHSEALELENGIKSSRRLENFC
Db1	563	SLENCABA.....PERVGPCFLER.KDDFQMYAKYQNKPRSETIWRKYSE.....C
Ost	510	ELESCIDC.....PELVGRCFLEER.MEEFQIYEKYQNKPRSESLWRQCS.....C
Ect2	343	DLEDLIANWDE.....SRSIGDIFLKYAKDLVKTYPPFVNFEMSKEMIIKCEK..QKPRFH
FGD1	439	ELEKRMEEWDR.....YPRIGDILQKLAPFLKMYGEYVKNFDRAVELVNTWTERSTQFKVII
CDEP	666	RDF.ELQKVY...LPLNTFLLRPLHRLMHYKQVL.ERLCKHPPSHADFRDCRAALAEITEMVA
Db1	609	AFQECQKRLKHR.LRLDSYLLKPVQRTIKYQLLKE.LLKYSKDCGSA.LLKKALDAMLDL...
Ost	556	PFFQECQKLDHK..LSLDSYLLKPVQRTIKYQLLKE.MLKYSKHCEGAE.DLQEALSSILGI...
Ect2	400	AFLKINQAKPECGRQSLVELLIRPVQRPVSALLND.LKXHTADENPKSTLEKAIGSLKEV...
FGD1	496	H...EVQKEEACGNLTLOHHMLEPVQRIPRYELLKLDYLKLPHGS.PDSKDAQKSLELIATA...
CDEP	726	QLHGTWIKMENF
Db1	669LKSVD
Ost	616LKAVD
Ect2	460MTHND
FGD1	555AEHSNA

5

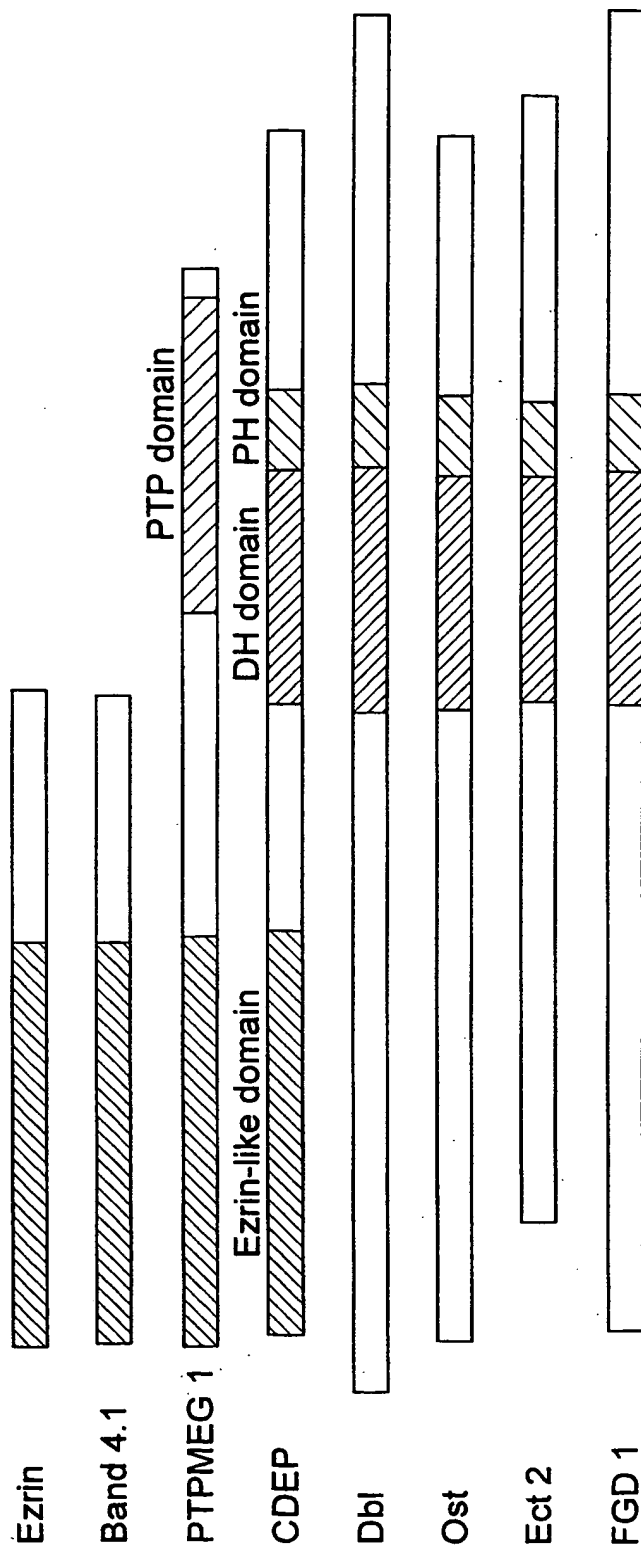


図 6

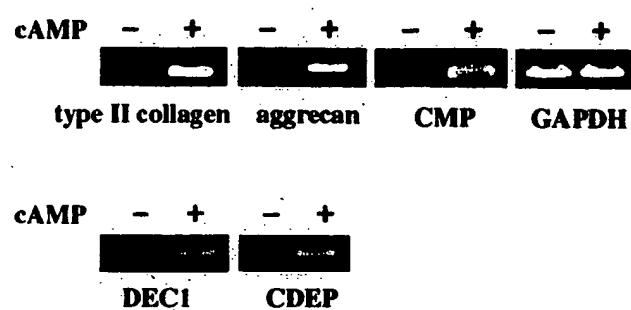
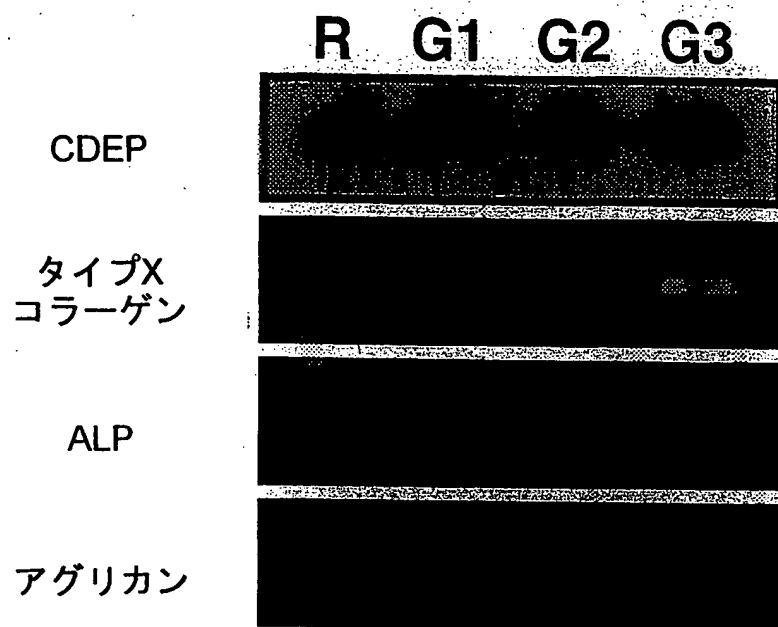


図 7



8

PTH(1-84) 10^{-7} M

コントロール

day 6 14 22 26 6 14 22 26



図 9

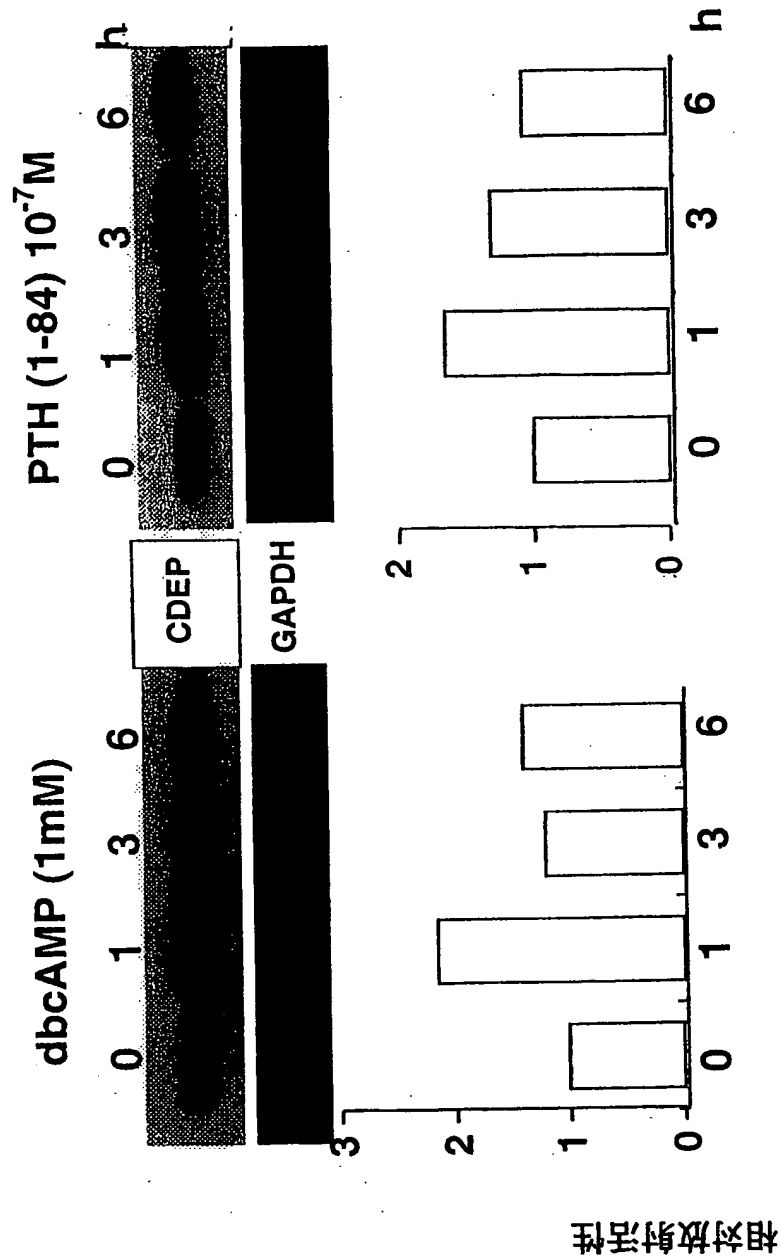


図10

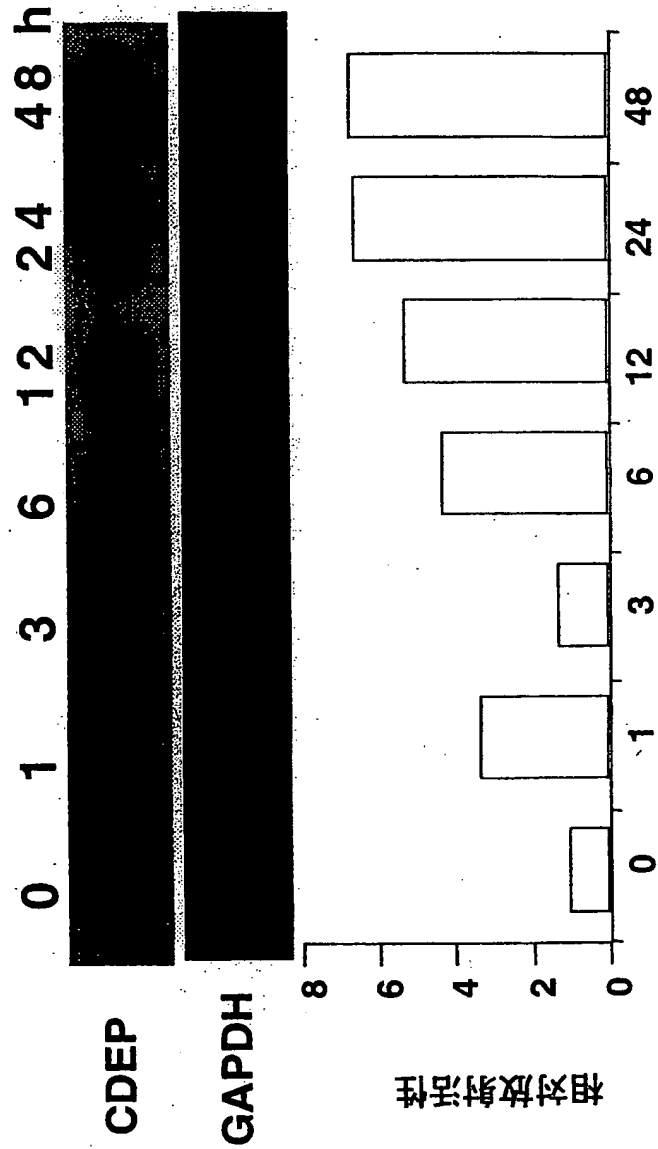
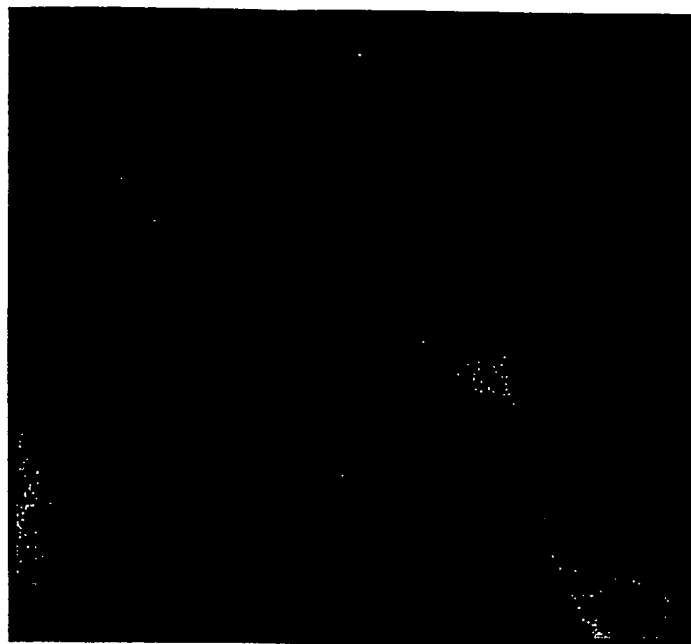
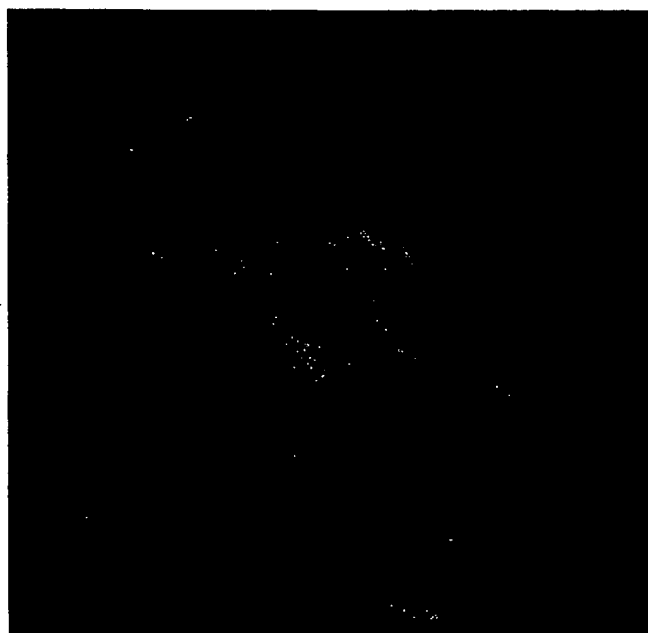


図11A



CNF2 (-)

図11B



CNF2 (+)

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> cDNA and deduced amino acid sequence in human fetus chondrocytes

<130> CGS98-04PCT

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3442

<212> DNA

<213> Homo sapiense

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(3183)

<400> 1

cgccgcagcc gccggcgctg tggagatatt ctctaagccg ctttcac atg gga gaa 57

Met Gly Glu

1

ata gag cag agg ccg acc cca gga tca cga ctg ggg gcc ccg gaa aat 105

Ile Glu Gln Arg Pro Thr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Ala Pro Glu Asn

5

10

15

tcg ggg atc agt acc ttg gaa cgt gga cag aag ccg ccc cca aca cct 153

Ser Gly Ile Ser Thr Leu Glu Arg Gly Gln Lys Pro Pro Pro Thr Pro

20

25

30

35

tca gga aaa ctc gtg tcc atc aaa atc cag atg ctg gat gac acc cag 201

Ser Gly Lys Leu Val Ser Ile Lys Ile Gln Met Leu Asp Asp Thr Gln

40

45

50

gag gca ttt gaa gtt cca caa aga gct cct ggg aag gtg ctg ctg gat 249

Glu Ala Phe Glu Val Pro Gln Arg Ala Pro Gly Lys Val Leu Leu Asp

55

60

65

gca gtt tgc aac cac ctc aac ctc gtg gaa ggt gac tat ttt ggc ctc 297

Ala Val Cys Asn His Leu Asn Leu Val Glu Gly Asp Tyr Phe Gly Leu
70 75 80

5 gag ttt cct gat cac aaa aag atc acg gtg tgg ctg gat ctc cta aaa 345
Glu Phe Pro Asp His Lys Lys Ile Thr Val Trp Leu Asp Leu Leu Lys
85 90 95

10 ccc att gtg aaa cag att aga agg cca aag cac gtt gtt gtt aag ttt 393
Pro Ile Val Lys Gln Ile Arg Arg Pro Lys His Val Val Val Lys Phe
100 105 110 115

15 gtg gtg aaa ttc ttt ccg cct gac cac aca caa ctc caa gaa gaa ctc 441
Val Val Lys Phe Phe Pro Pro Asp His Thr Gln Leu Gln Glu Glu Leu
120 125 130

aca agg tac ctg ttc gcg ctg cag gtg aag cag gac ttg gct caa ggc 489
Thr Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Gln Val Lys Gln Asp Leu Ala Gln Gly
135 140 145

20 agg ttg acg tgt aat gac acc agc gca gct ctc ttg att tca cac att 537
Arg Leu Thr Cys Asn Asp Thr Ser Ala Ala Leu Leu Ile Ser His Ile
150 155 160

25 gtg caa tct gag att ggg gat ttt gat gaa gcc ttg gac aga gag cac 585
Val Gln Ser Glu Ile Gly Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp Arg Glu His
165 170 175

30 tta gca aaa aat aaa tac ata cct cag caa gac gca cta gag gac aaa 633
Leu Ala Lys Asn Lys Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu Glu Asp Lys
180 185 190 195

35 atc gtg gaa ttt cac cat aac cac att gga caa aca cca gca gaa tca 681
Ile Val Glu Phe His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro Ala Glu Ser
200 205 210

gat ttc cag ctc cta gag att gcc cgt cgg cta gag atg tat gga atc 729
Asp Phe Gln Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met Tyr Gly Ile
215 220 225

40 cgg ttg cac ccg gcc aag gac agg gaa ggc acg aag atc aat ctg gcc 777
Arg Leu His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile Asn Leu Ala
230 235 240

45 gtt gcc aac acg gga att cta gtg ttt cag ggt ttc act aag atc aat 825
Val Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe Thr Lys Ile Asn

	245	250	255	
	gcc ttc aac tgg gcc aag gtg cgg aag ctg agc ttc aag agg aag cgc			873
	Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser Phe Lys Arg Lys Arg			
5	260	265	270	275
	ttt ctc atc aag ctc cgg cca gat gcc aat agt gcg tac cag gat acc			921
	Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Thr			
	280	285	290	
10	ttg gaa ttc ctg atg gcc agt cgg gat ttc tgc aag tcc ttc tgg aaa			969
	Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp Phe Cys Lys Ser Phe Trp Lys			
	295	300	305	
15	atc tgt gtt gaa cat cat gcc ttc ttt aga ctt ttt gaa gag ccc aaa			1017
	Ile Cys Val Glu His His Ala Phe Phe Arg Leu Phe Glu Glu Pro Lys			
	310	315	320	
20	cca aag ccc aag ccc gtc ctc ttt agc cgg ggg tca tca ttt cgg ttc			1065
	Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu Phe Ser Arg Gly Ser Ser Phe Arg Phe			
	325	330	335	
25	agt ggt cgg act cag aag cag gtt ctc gac tat gtt aaa gaa gga gga			1113
	Ser Gly Arg Thr Gln Lys Gln Val Leu Asp Tyr Val Lys Glu Gly Gly			
	340	345	350	355
30	cat aag aag gtg cag ttt gaa agg aag cac agc aag att cat tct atc			1161
	His Lys Lys Val Gln Phe Glu Arg Lys His Ser Lys Ile His Ser Ile			
	360	365	370	
35	cgg agc ctt gct tca cag cct aca gaa ctg aat tcg gaa gtg ctg gag			1209
	Arg Ser Leu Ala Ser Gln Pro Thr Glu Leu Asn Ser Glu Val Leu Glu			
	375	380	385	
40	cag tct cag cag agc acc agc ctt aca ttt gga gaa ggt gcc gaa tct			1257
	Gln Ser Gln Gln Ser Thr Ser Leu Thr Phe Gly Glu Gly Ala Glu Ser			
	390	395	400	
45	cca ggg ggc cag agc tgc cgg cga gga aag gaa ccg aag gtt tcc gcc			1305
	Pro Gly Gly Gln Ser Cys Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys Val Ser Ala			
	405	410	415	
50	ggg gag ccg ggg tcg cac ccg agc cct gcg ccg agg aga agc ccc gcg			1353
	Gly Glu Pro Gly Ser His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg Ser Pro Ala			
	420	425	430	435

ggt aac aag cag gcg gac gga gcc gcc tcg gcg ccc acg gag gaa gag 1401
 Gly Asn Lys Gln Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr Glu Glu Glu
 440 445 450

5

gag gag gtc gtt aag gat agg acc cag cag agt aaa cct cag ccc ccg 1449
 Glu Glu Val Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro Gln Pro Pro
 455 460 465

10

cag cca agc aca ggc tcc ctg act ggc agt cct cac ctt tcc gag ctg 1497
 Gln Pro Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu Ser Glu Leu
 470 475 480

15

tct gtg aac tcg cag ggg gga gtg gcc cct gcc aac gtg acc ttg tct 1545
 Ser Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn Val Thr Leu Ser
 485 490 495

20

ccc aac ctg agc ccc gac acc aag cag gcc tct ccc ttg atc agc ccg 1593
 Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser Pro Leu Ile Ser Pro
 500 505 510 515

25

ctg ctg aat gac cag gcc tgc ccc cgg acg gac gat gag gat gag ggc 1641
 Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr Asp Asp Glu Asp Glu Gly
 520 525 530

30

cgg agg aag aga ttc cca act gat aaa gcg tac ttc ata gct aag gaa 1689
 Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys Ala Tyr Phe Ile Ala Lys Glu
 535 540 545

35

gtg tct acc acc gag cga aca tat ctg aag gat ctc gaa gtt atc act 1737
 Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr Leu Lys Asp Leu Glu Val Ile Thr
 550 555 560

40

tcg tgg ttt cag agc aca gtg agc aaa gag gac gcc atg ccg gaa gca 1785
 Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val Ser Lys Glu Asp Ala Met Pro Glu Ala
 565 570 575

45

ctg aaa agt ctc ata ttc ccg aat ttt gaa cct ttg cac aaa ttt cat 1833
 Leu Lys Ser Leu Ile Phe Pro Asn Phe Glu Pro Leu His Lys Phe His
 580 585 590 595

act aat ttt ctc aag gaa att gag caa cga ctt gcc ctg tgg gaa ggc 1881
 Thr Asn Phe Leu Lys Glu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Leu Trp Glu Gly
 600 605 610

	cgc tca aat gcc caa atc aga gat tac caa aga atc ggc gat gtc atg	1929
	Arg Ser Asn Ala Gln Ile Arg Asp Tyr Gln Arg Ile Gly Asp Val Met	
	615 620 625	
5	ctg aag aac att cag ggc atg aag cac ctg gcg gct cac ctg tgg aag	1977
	Leu Lys Asn Ile Gln Gly Met Lys His Leu Ala Ala His Leu Trp Lys	
	630 635 640	
10	cac agc gag gcc ttg gag gcc ctg gag aat gga atc aag agc tcc cgg	2025
	His Ser Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys Ser Ser Arg	
	645 650 655	
15	cgg ctg gag aac ttc tgc aga gac ttt gag ctg cag aag gtg tgt tac	2073
	Arg Leu Glu Asn Phe Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys Val Cys Tyr	
	660 665 670 675	
20	cta ccg ctc aac acc ttc ctc ctg cgg cca ctg cac cgg ctc atg cac	2121
	Leu Pro Leu Asn Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg Leu Met His	
	680 685 690	
25	tac aag cag gtc ctg gag cgg ctg tgc aaa cac cac ccg ccg agc cac	2169
	Tyr Lys Gln Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro Pro Ser His	
	695 700 705	
30	gcc gac ttc agg gac tgc cga gcc gct ttg gca gag atc acg gag atg	2217
	Ala Asp Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile Thr Glu Met	
	710 715 720	
35	gtg gca cag ctc cac ggt acg atg atc aag atg gag aat ttc cag aag	2265
	Val Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu Asn Phe Gln Lys	
	725 730 735	
40	ctg cac gaa ctc aag aaa gat ttg att ggc att gac aat ctt gtg gtt	2313
	Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile Asp Asn Leu Val Val	
	740 745 750 755	
45	ccg gga agg gag ttc atc cgt ctg ggc agc ctc agc aag ctc tcg ggg	2361
	Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser Leu Ser Lys Leu Ser Gly	
	760 765 770	
50	aag ggg ctc cag cag cgc atg ttc ttc ctg ttc aac gac gtc ctg cta	2409
	Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe Leu Phe Asn Asp Val Leu Leu	
	775 780 785	
55	tac acg agc cgg ggg ctg acg gcc tcc aat cag ttt aaa gtc cac ggg	2457

	Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala Ser Asn Gln Phe Lys Val His Gly	
	790 795 800	
5	cag ctc ccg ctc tat ggc atg acg att gag gag agc gaa gac gag tgg Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met Thr Ile Glu Glu Ser Glu Asp Glu Trp	2505
	805 810 815	
10	ggg gtg ccc cac tgc ctg acc ctc cgg ggc cag cgg cag tcc atc atc Gly Val Pro His Cys Leu Thr Leu Arg Gly Gln Arg Gln Ser Ile Ile	2553
	820 825 830 835	
15	gtg gcc gcc agt tct cgg tcc gag atg gag aag tgg gtt gag gac atc Val Ala Ala Ser Ser Arg Ser Glu Met Glu Lys Trp Val Glu Asp Ile	2601
	840 845 850	
20	cag atg gcc att gac ctg gcg gag aag agc agc agc ccc gcc cct gag Gln Met Ala Ile Asp Leu Ala Glu Lys Ser Ser Ser Pro Ala Pro Glu	2649
	855 860 865	
25	ttc ctg gcc agc agc ccc cct gac aac aag tcc cct gat gaa gcc acc Phe Leu Ala Ser Ser Pro Pro Asp Asn Lys Ser Pro Asp Glu Ala Thr	2697
	870 875 880	
30	gcg gct gac cag gag tca gag gat gac ctg agc gcc tcg cgc aca tcg Ala Ala Asp Gln Glu Ser Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser Arg Thr Ser	2745
	885 890 895	
35	ctg gag cgc cag gcc ccg cac cgc ggc aac aca atg gtg cac gtg tgc Leu Glu Arg Gln Ala Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val His Val Cys	2793
	900 905 910 915	
40	tgg cac cgc aac acc agc gtc tcc atg gtg gac ttc agc atc gca gtg Trp His Arg Asn Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser Ile Ala Val	2841
	920 925 930	
45	gag aat cag ttg tct gga aac ctg ctg agg aaa ttc aaa aac agc aac Glu Asn Gln Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys Asn Ser Asn	2889
	935 940 945	
50	ggg tgg cag aag ctg tgg gtg gtg ttc aca aac ttc tgc ctg ttc ttc Gly Trp Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys Leu Phe Phe	2937
	950 955 960	
55	tac aaa tca cac cag gac aat cat ccc ctt gcc agc ctg cct ctg ctc Tyr Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser Leu Pro Leu Leu	2985

965 970 975
 ggc tac tgc ctc acc atc ccc tct gag tcc gag aac atc cag aaa gac 3033
 Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu Asn Ile Gln Lys Asp
 5 980 985 990 995
 tac gtg ttc aag ctg cac ttc aag tcc cac gtc tac tac ttc agg gcg 3081
 Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His Val Tyr Tyr Phe Arg Ala
 1000 1005 1010
 10 gaa agc gag tac acg ttc gaa agg tgg atg gaa gtg atc cgc agt gcc 3129
 Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp Met Glu Val Ile Arg Ser Ala
 1015 1020 1025
 15 acc agc tct gcc tgc cga ccc cac gtg ttg agc cac aaa gag tct ctt 3177
 Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His Val Leu Ser His Lys Glu Ser Leu
 1030 1035 1040
 20 gtg tat tgatggccgg acacactcgt ttccgcagtg gctgctttcc tggaagacgt 3233
 Val Tyr
 1045
 ttccctttctt ctgtattaat gaagccctggt aaaattaaca cctgtctgaa aatcaaaaaac 3293
 25 atggcttccc agcagctctc ctgtctccac agccgcgttt tttaaccccg acctctcagc 3353
 gtttgaatga acagcgetcc cacctccagt cctggcatcc gctggggggcg ctgttcttta 3413
 gctagtgccca gtattaaaaac attgtcatt 3442
 30
 <210> 2
 <211> 1045
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Gly Glu Ile Glu Gln Arg Pro Thr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 40 Pro Glu Asn Ser Gly Ile Ser Thr Leu Glu Arg Gly Gln Lys Pro Pro
 20 25 30
 Pro Thr Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Ile Lys Ile Gln Met Leu Asp
 45 35 40 45

Asp Thr Gln Glu Ala Phe Glu Val Pro Gln Arg Ala Pro Gly Lys Val
 50 55 60

5 Leu Leu Asp Ala Val Cys Asn His Leu Asn Leu Val Glu Gly Asp Tyr
 65 70 75 80

Phe Gly Leu Glu Phe Pro Asp His Lys Lys Ile Thr Val Trp Leu Asp
 85 90 95

10 Leu Leu Lys Pro Ile Val Lys Gln Ile Arg Arg Pro Lys His Val Val
 100 105 110

Val Lys Phe Val Val Lys Phe Phe Pro Pro Asp His Thr Gln Leu Gln
 15 115 120 125

Glu Glu Leu Thr Arg Tyr Leu Phe Ala Leu Gln Val Lys Gln Asp Leu
 130 135 140

20 Ala Gln Gly Arg Leu Thr Cys Asn Asp Thr Ser Ala Ala Leu Leu Ile
 145 150 155 160

Ser His Ile Val Gln Ser Glu Ile Gly Asp Phe Asp Glu Ala Leu Asp
 165 170 175

25 Arg Glu His Leu Ala Lys Asn Lys Tyr Ile Pro Gln Gln Asp Ala Leu
 180 185 190

Glu Asp Lys Ile Val Glu Phe His His Asn His Ile Gly Gln Thr Pro
 30 195 200 205

Ala Glu Ser Asp Phe Gln Leu Leu Glu Ile Ala Arg Arg Leu Glu Met
 210 215 220

35 Tyr Gly Ile Arg Leu His Pro Ala Lys Asp Arg Glu Gly Thr Lys Ile
 225 230 235 240

Asn Leu Ala Val Ala Asn Thr Gly Ile Leu Val Phe Gln Gly Phe Thr
 245 250 255

40 Lys Ile Asn Ala Phe Asn Trp Ala Lys Val Arg Lys Leu Ser Phe Lys
 260 265 270

Arg Lys Arg Phe Leu Ile Lys Leu Arg Pro Asp Ala Asn Ser Ala Tyr
 45 275 280 285

Gln Asp Thr Leu Glu Phe Leu Met Ala Ser Arg Asp Phe Cys Lys Ser
 290 295 300

5 Phe Trp Lys Ile Cys Val Glu His His Ala Phe Phe Arg Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Glu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Val Leu Phe Ser Arg Gly Ser Ser
 325 330 335

10 Phe Arg Phe Ser Gly Arg Thr Gln Lys Gln Val Leu Asp Tyr Val Lys
 340 345 350

Glu Gly Gly His Lys Lys Val Gln Phe Glu Arg Lys His Ser Lys Ile
 15 355 360 365

His Ser Ile Arg Ser Leu Ala Ser Gln Pro Thr Glu Leu Asn Ser Glu
 370 375 380

20 Val Leu Glu Gln Ser Gln Gln Ser Thr Ser Leu Thr Phe Gly Glu Gly
 385 390 395 400

Ala Glu Ser Pro Gly Gly Gln Ser Cys Arg Arg Gly Lys Glu Pro Lys
 405 410 415

25 Val Ser Ala Gly Glu Pro Gly Ser His Pro Ser Pro Ala Pro Arg Arg
 420 425 430

Ser Pro Ala Gly Asn Lys Gln Ala Asp Gly Ala Ala Ser Ala Pro Thr
 30 435 440 445

Glu Glu Glu Glu Glu Val Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Ser Lys Pro
 450 455 460

35 Gln Pro Pro Gln Pro Ser Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Pro His Leu
 465 470 475 480

Ser Glu Leu Ser Val Asn Ser Gln Gly Gly Val Ala Pro Ala Asn Val
 485 490 495

40 Thr Leu Ser Pro Asn Leu Ser Pro Asp Thr Lys Gln Ala Ser Pro Leu
 500 505 510

Ile Ser Pro Leu Leu Asn Asp Gln Ala Cys Pro Arg Thr Asp Asp Glu
 45 515 520 525

Asp Glu Gly Arg Arg Lys Arg Phe Pro Thr Asp Lys Ala Tyr Phe Ile
 530 535 540

5 Ala Lys Glu Val Ser Thr Thr Glu Arg Thr Tyr Leu Lys Asp Leu Glu
 545 550 555 560

Val Ile Thr Ser Trp Phe Gln Ser Thr Val Ser Lys Glu Asp Ala Met
 565 570 575

10 Pro Glu Ala Leu Lys Ser Leu Ile Phe Pro Asn Phe Glu Pro Leu His
 580 585 590

Lys Phe His Thr Asn Phe Leu Lys Glu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Leu
 15 595 600 605

Trp Glu Gly Arg Ser Asn Ala Gln Ile Arg Asp Tyr Gln Arg Ile Gly
 610 615 620

20 Asp Val Met Leu Lys Asn Ile Gln Gly Met Lys His Leu Ala Ala His
 625 630 635 640

Leu Trp Lys His Ser Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Asn Gly Ile Lys
 645 650 655

25 Ser Ser Arg Arg Leu Glu Asn Phe Cys Arg Asp Phe Glu Leu Gln Lys
 660 665 670

Val Cys Tyr Leu Pro Leu Asn Thr Phe Leu Leu Arg Pro Leu His Arg
 30 675 680 685

Leu Met His Tyr Lys Gln Val Leu Glu Arg Leu Cys Lys His His Pro
 690 695 700

35 Pro Ser His Ala Asp Phe Arg Asp Cys Arg Ala Ala Leu Ala Glu Ile
 705 710 715 720

Thr Glu Met Val Ala Gln Leu His Gly Thr Met Ile Lys Met Glu Asn
 725 730 735

40 Phe Gln Lys Leu His Glu Leu Lys Lys Asp Leu Ile Gly Ile Asp Asn
 740 745 750

Leu Val Val Pro Gly Arg Glu Phe Ile Arg Leu Gly Ser Leu Ser Lys
 45 755 760 765

Leu Ser Gly Lys Gly Leu Gln Gln Arg Met Phe Phe Leu Phe Asn Asp
 770 775 780

5 Val Leu Leu Tyr Thr Ser Arg Gly Leu Thr Ala Ser Asn Gln Phe Lys
 785 790 795 800

Val His Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Met Thr Ile Glu Glu Ser Glu
 805 810 815

10 Asp Glu Trp Gly Val Pro His Cys Leu Thr Leu Arg Gly Gln Arg Gln
 820 825 830

Ser Ile Ile Val Ala Ala Ser Ser Arg Ser Glu Met Glu Lys Trp Val
 15 835 840 845

Glu Asp Ile Gln Met Ala Ile Asp Leu Ala Glu Lys Ser Ser Ser Pro
 850 855 860

20 Ala Pro Glu Phe Leu Ala Ser Ser Pro Pro Asp Asn Lys Ser Pro Asp
 865 870 875 880

Glu Ala Thr Ala Ala Asp Gln Glu Ser Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ser
 885 890 895

25 Arg Thr Ser Leu Glu Arg Gln Ala Pro His Arg Gly Asn Thr Met Val
 900 905 910

His Val Cys Trp His Arg Asn Thr Ser Val Ser Met Val Asp Phe Ser
 30 915 920 925

Ile Ala Val Glu Asn Gln Leu Ser Gly Asn Leu Leu Arg Lys Phe Lys
 930 935 940

35 Asn Ser Asn Gly Trp Gln Lys Leu Trp Val Val Phe Thr Asn Phe Cys
 945 950 955 960

Leu Phe Phe Tyr Lys Ser His Gln Asp Asn His Pro Leu Ala Ser Leu
 965 970 975

40 Pro Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Thr Ile Pro Ser Glu Ser Glu Asn Ile
 980 985 990

Gln Lys Asp Tyr Val Phe Lys Leu His Phe Lys Ser His Val Tyr Tyr
 45 995 1000 1005

Phe Arg Ala Glu Ser Glu Tyr Thr Phe Glu Arg Trp Met Glu Val Ile
1010 1015 1020

5 Arg Ser Ala Thr Ser Ser Ala Ser Arg Pro His Val Leu Ser His Lys
025 1030 1035 1040

Glu Ser Leu Val Tyr
1045

10

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

15

<220>
<223> probe

20

<400> 3
cataccggta agtggggcaa gactg 25

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
25 <213> Artificial

<220>
<223> probe

30

<400> 4
tgcccagttc aggtctctta 20

<210> 5
<211> 20
35 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

40

<400> 5
tgctacttca tegaccccat 20

<210> 6
45 <211> 20

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> probe

<400> 6
aaagacctca ccctccatct 20

10 <210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> probe

<400> 7
gtcgattacg tggagagcta 20

20 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> probe

<400> 8
atgaacttct tcaccagctc 20

30 <210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> probe

40 <400> 9
gtcaaggctg agaacgggaa 20

<210> 10
<211> 20
45 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

5

<400> 10

tccaccaccc tggtgctgta 20

<210> 11

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

15

<223> probe

<400> 11

atcagaccca gctcccaaag 20

<210> 12

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

25

<223> probe

<400> 12

cacagaccca gctcccaaac 20

<210> 13

30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

35

<223> probe

<400> 13

40

ccttcaggaa aactcgtgtc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

45

<213> Artificial

<220>

<223> probe

5

<400> 14

ttggagttgt gtgtggtcag 20

<210> 15

<211> 25

10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

15

<400> 15

gccaaaatag tcaccttcca cgagg 25

<210> 16

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

25

<223> probe

<400> 16

ccttcaggaa aactcgtgtc 20

30

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

35

<220>

<223> probe

<400> 17

aaacgraaga aygtrtgrtg ytcwacaca 29

40

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

45

<220>
<223> probe

<400> 18
5 ttccagctcc tagagattgc 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 19
15 tcgtcttcgc tctcctcaat 20

<210> 20
<211> 23
20 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> probe

<400> 20
25 cgggtaacaa gcaggcggac gga 23

<210> 21
30 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
35 <223> probe

<400> 21
tcacttcgtg gtttcagagc 20

<210> 22
40 <211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
45

<223> probe

<400> 22

tctgtcttcgc tctcctcaat 20

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C12P21/02, G01N33/53 // A61K38/16, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68, C12P21/02, G01N33/53, A61K38/16, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Yasuhiko K. et al., "Molecular Cloning and Characterization of CDEP, a Novel Human Protein Containing the Ezrin-like Domain of the Band 4.1 Superfamily and the Db1 Homology Domain of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors", Biophysical Research Communications (December 18, 1997), Vol. 241, No. 2, p.369-375	1-10
A	Ming S. et al., "Molecular Characterization of the Novel Basic Helix-Loop-Helix-Protein DEC1 Expressed in Differentiated Human Embryo Chondrocytes", Biological and Biophysical Research Communications (July 18, 1997), Vol. 236, No. 2, p.294-298	1-10
A	Willy D. et al., "Isolation of Markers for Chondro-osteogenic Differentiation Using cDNA Library Subtraction" Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 32, p.19475-19482	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 22 January, 1999 (22. 01. 99)

 Date of mailing of the international search report
 2 February, 1999 (02. 02. 99)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/05348

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N33/53, // A61K 38/16, A61K45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N33/53, A61K 38/16, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Yasuhiko K. et al., "Molecular Cloning and Characterization of CDEP, a Novel Human Protein Containing the Ezrin-like Domain of the Band 4.1 Superfamily and the Dbl Homology Domain of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors", Biophysical Research Communications(December 18, 1997), Vol. 241, No. 2, p. 369-375	1-10
A	Ming S. et al., "Molecular Characterization of the Novel Basic Helix-Loop-Helix-Protein DEC1 Expressed in Differentiated Human Embryo Chondrocytes", Biological and Biophysical Research Communications(July 18, 1997), Vol. 236, No. 2, p. 294-298	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.01.99

国際調査報告の発送日

02.02.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4 B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Willy D. et al., "Isolation of Markers for Chondro-osteogenic Differentiation Using cDNA Library Subtraction" Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 32, p. 19475-19482	1-10

P C T



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 CGS 98-04 PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/05348	国際出願日 (日.月.年) 27.11.98	優先日 (日.月.年) 27.11.97
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 5 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N33/53, // A61K 38/16, A61K45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N33/53, A61K 38/16, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Yasuhiko K. et al., "Molecular Cloning and Characterization of CDEP, a Novel Human Protein Containing the Ezrin-like Domain of the Band 4.1 Superfamily and the Db1 Homology Domain of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors", Biophysical Research Communications(December 18, 1997), Vol. 241, No. 2, p. 369-375	1-10
A	Ming S. et al., "Molecular Characterization of the Novel Basic Helix-Loop-Helix-Protein DECl Expressed in Differentiated Human Embryo Chondrocytes", Biological and Biophysical Research Communications(July 18, 1997), Vol. 236, No. 2, p. 294-298	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他のI以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.01.99

国際調査報告の発送日

02.02.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4 B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Willy D. et al., "Isolation of Markers for Chondro-osteogenic Differentiation Using cDNA Library Subtraction" Journal of Biological Chemistry (1996), Vol. 271, No. 32, p. 19475-19482	1-10

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔P C T 3 6 条 及 び P C T 規 則 7 0〕

REC'D 06 AUG 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 CGS 98-04 PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 8 / 0 5 3 4 8	国際出願日 (日.月.年) 27.11.98	優先日 (日.月.年) 27.11.97
国際特許分類 (I P C) Int.Cl. ⁸ C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N33/53, // A61K 38/16, A61K45/00		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 3 6 条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(P C T 規則70.16及びP C T 実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ P C T 3 5 条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.11.98	国際予備審査報告を作成した日 19.07.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9 1 5 2

様式PCT/I P E A / 4 0 9 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

1-10

有

請求の範囲

無

進歩性 (IS)

請求の範囲

1-10

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

1-10

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-10に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

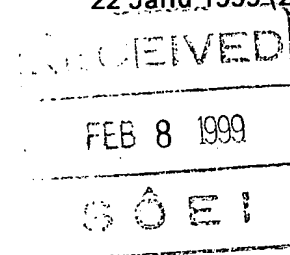
To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei International Patent Firm
6F., Kyobashi National Building
13-10, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 02 February 1999 (02.02.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference CGS 98-04 PCT	
International application No. PCT/JP98/05348	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98) Priority date (day/month/year) 27 November 1997 (27.11.97)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
27 Nove 1997 (27.11.97)	9/342060	JP	22 Janu. 1999 (22.01.99)



The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

002454273

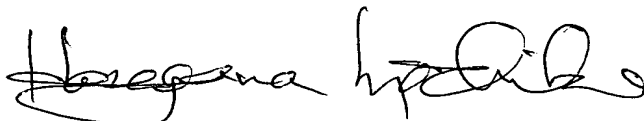
VERIFICATION

The undersigned, of the below address, hereby certifies that he/she well knows both the English and Japanese languages, and that the attached is an accurate English translation of the PCT application filed on November 27, 1998 under No. PCT/JP98/05348.

The undersigned declares further that all statements made herein of his/her own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Signed this 16th day of May, 2000.

Signature:



Name: HASEGAWA Yoshiki

Address: c/o Soei Patent and Law Firm

Okura-Honkan, 6-12, Ginza 2-chome, Chuo-ku,

Tokyo 104-0061 Japan

PCT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HASEGAWA, Yoshiki
Soei International Patent Firm
6F., Kyobashi National Building
13-10, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 10 June 1999 (10.06.99)		RECEIVED 99.6.11 SOEI	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference CGS 98-04 PCT			
International application No. PCT/JP98/05348	International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98)	Priority date (day/month/year) 27 November 1997 (27.11.97)	
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,EP,IL,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HR,HU,ID,
IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,
SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
10 June 1999 (10.06.99) under No. WO 99/28458

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

1642
RECEIVED

NOV 27 2000

TECH CENTER 1600/2900

16c1
135
Translation
09/555342
05-00

Applicant's or agent's file reference CGS 98-04 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/05348	International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98)	Priority date (day/month/year) 27 November 1997 (27.11.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C12Q 1/68, C12P 21/02, G01N 33/53 // A61K 38/16, 45/00		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 November 1998 (27.11.98)	Date of completion of this report 19 July 1999 (19.07.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/05348

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 98/05348

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The invention described in Claims 1-10 is not described in any of the documents cited in the international search report or in other documents deemed relevant to the field in question, nor is it obvious to a person skilled in the art.